



Generación de un potente vector adenoviral oncolítico y selectivo para neoplasias PVH+

IVÁN DELGADO ENCISO***, DANIEL CERVANTES GARCÍA**, ROCÍO ORTIZ LÓPEZ**,
HUGO BARRERA SALDAÑA**, AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ*,**

Los papilomavirus y las neoplasias en humanos



Actualmente se ha demostrado que los virus son la segunda causa más importante de cáncer en humanos, sólo el tabaquismo los supera. Los virus pueden contribuir al desarrollo de un 10 a 20% de todos los casos de cáncer en el mundo,¹ algunos de los cuales son muy comunes, como el cáncer cérvico-uterino (CaCU). Hoy en día se reconoce que el virus oncogénico más importante es el papilomavirus humano (PVH).² Existen más de 100 PVHs, algunos de los cuales son relativamente comunes (como el 6 y 11) y rara vez se encuentran asociados a neoplasias malignas (denominados de bajo riesgo); pero otros tipos, principalmente el 16 y en menor proporción los tipos 18, 45, 31, 33, 35, etc., están frecuentemente asociados a tumores malignos (llamados de alto riesgo).² Sin duda, el CaCU es la neoplasia maligna asociada a PVH de mayor morbi-mortalidad.³

□ El presente artículo está basado en la investigación "Generación de un potente vector adenoviral oncolítico y altamente selectivo contra neoplasias asociadas al papilomavirus humano", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2008 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2008.

Sin embargo, estos virus también causan otros tumores malignos como el cáncer de recto y ano, cáncer de vulva, cáncer de pene, y algunos cánceres de cabeza y de cuello.^{4,5}

El CaCU es la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial,⁶ pero en México es la primera causa de mortalidad por cáncer en el sexo femenino.⁷ Esta neoplasia tiene un enorme impacto sobre la estructura familiar y social, ya que estas mujeres mueren en una etapa aún productiva.² El CaCU es una enfermedad multifactorial y, hasta la fecha, el único factor vinculado directamente con su desarrollo es la infección crónica por los PVHs,⁸ pues se ha demostrado que su DNA se encuentra en casi en 100% de las pacientes.

Los orígenes tisulares de las neoplasias asociadas a PVH son diversos, y aunque a nivel mundial el CaCU es la neoplasia asociada a PVH más importante, si se suman el resto de las neoplasias malignas asociadas al mismo agente viral, éstas tendrían un impacto similar al del CaCU en algunos países. Para mostrar la importancia epidemiológica de otras neoplasias asociadas a PVH, se puede

*Departamento de Bioquímica, FM-UANL.

E-mail: arojas@fm.uanl.mx).

**Laboratorio de Terapia Génica, Departamento de Bioquímica, FM-UANL.

***Facultad de Medicina, Universidad de Colima. Colima, México

mencionar que mientras se diagnosticaron 13,000 casos nuevos de CaCU en EUA (estimaciones de 2002), también fueron detectados 3,800 casos de cáncer de vulva, 2,000 de cáncer de vagina, 1,200 neoplasias de pene, 3,900 de neoplasias ano-rectales y 28,900 tumores de cavidad oral y de faringe.⁹ Todas estas neoplasias están asociadas en diferente grado a la presencia de un PVH de alto riesgo, oscilando la positividad de este virus de 20 hasta 100% en los tumores mencionados anteriormente.¹⁰⁻¹⁴ Otras neoplasias escamosas (esófago¹⁵ y pulmón¹⁶) comienzan también a relacionarse con los PVHs, por lo que en el futuro se podría reconocer a los PVHs como agentes etiológicos o coadyuvantes de otro gran porcentaje de tumores. Por todo lo anterior, se puede evidenciar el potencial e impacto que podría tener el desarrollo de drogas «antipapilomavirales» efectivas.

Tratamiento actual de las neoplasias asociadas a PVH

Las neoplasias en estadios tempranos son tratadas quirúrgicamente, lo cual es curativo en la mayoría de los casos. En estadios avanzados (en CaCU, estadio IIb o superiores), la radioterapia y la quimioterapia son los únicos tratamientos ampliamente establecidos, los cuales, además de ser únicamente paliativos, suelen estar acompañados de efectos adversos que afectan la calidad de vida del paciente.¹⁷ En el caso del CaCU, bajo los tratamientos actuales, se ha estimado que puede haber un riesgo de recurrencia de hasta un 47%, dependiendo de las características del paciente y del grado de la enfermedad¹⁸ y que la supervivencia a cinco años en pacientes con estadio III o IV no es superior a 35 %.¹⁹ Por lo anterior, son necesarios nuevos esquemas terapéuticos para combatir el CaCU y otras neoplasias asociadas a PVHs.

Generación de un VAO para lesiones neoplásicas ocasionadas por PVHs

Todas las neoplasias asociadas a los PVHs, sea cual

sea su origen primario y sean benignas, premalignas o malignas, tienen un descontrol en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Estas alteraciones son causadas, básicamente, por los mismos fenómenos oncogénicos: la expresión de las proteínas E7 y E6 de los PVHs.⁴ Así pues, todas las neoplasias asociadas a los PVHs tienen un denominador común: la expresión de los genes E6 y E7 de PVH. Los oncogenes E6 y E7 son controlados por un mismo promotor denominado región reguladora río arriba (URR, por sus siglas en inglés). Este promotor es regulado por complejas interacciones entre múltiples factores virales y celulares. El promotor URR determina la concentración intracelular de pE6 y pE7, las cuales, a su vez, desencadenan y mantienen el proceso carcinogénico.⁸ La actividad de URR es epitelio específica,²⁰ y es extremadamente alta en tejidos tumorales y prácticamente indetectable en tejidos sanos.^{21,22}

A pesar de esta patogénesis molecular, común en las neoplasias asociadas a PVH, son escasas las investigaciones que aprovechan esta peculiaridad molecular para generar una herramienta terapéutica antipapilomaviral. Actualmente, las terapias para carcinomas asociados a PVHs y sus lesiones precursoras no están dirigidas contra los mecanismos moleculares que las generan o que las mantienen. Se han desarrollado vacunas profilácticas contra PVH, pero también resulta interesante y prometedor desarrollar herramientas terapéuticas basadas en la biología molecular del PVH, las cuales servirían para combatir a lesiones precursoras o neoplasias malignas asociadas con este virus. Una posibilidad es la utilización de virus oncolíticos, tales como los vectores adenovirales oncolíticos (VAO). El efecto antitumoral de estos vectores es causado por la replicación de estos virus de manera preferente o restringida en el tejido neoplásico, con lo cual también se protege el tejido normal de un daño secundario (figura 1).²³

Los VAOs son actualmente los productos de terapia génica basados en vectores virales que más han avanzado en los ensayos clínicos para esta modalidad terapéutica. Actualmente ya hay un VAO

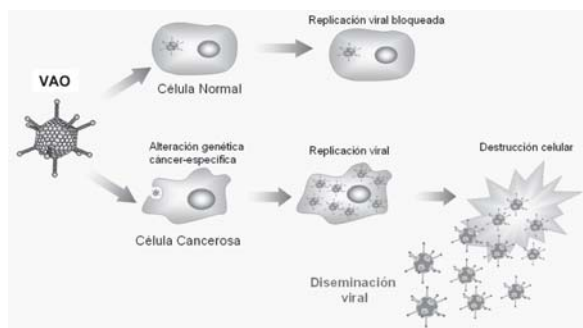


Fig. 1. Mecanismo de acción de un vector oncolítico. Los agentes virales pueden ser modificados para replicarse y destruir selectivamente a las células tumorales sin afectar a las células sanas.

llamado H101, que superó la fase clínica III y fue aprobado por la CSFDA. Los promotores cáncer/tejido-específicos representan una poderosa herramienta para controlar la replicación viral a través de dirigir la actividad reguladora del gen E1A adenoviral. Debido a que el gen E1A es muy importante y su ausencia bloquea la capacidad replicativa adenoviral, una de las estrategias para generar un VAO es someter la actividad de E1A bajo el control de un promotor tejido-específico o cáncer-específico, lo cual produce una expresión de E1A, replicación adenoviral y efectos líticos sólo en el tejido en donde el promotor es activo.²³ Previo al presente trabajo de investigación, ningún vector oncolítico ha usado el promotor URR para controlar la replicación, a pesar de que el promotor URR ha demostrado ser altamente activo y específico de células infectadas por PVH.

Los VAOs también pueden construirse mediante la generación de mutaciones específicas en los genes reguladores adenovirales, como el E1A. Mutaciones en el gen E1A adenoviral limitan la capacidad replicativa de los vectores en células sanas, pero la favorecen en células cuyas rutas metabólicas para la replicación de DNA y la apoptosis están alteradas, como en las células tumorales con disfunción en las vías de pRb-p300 (los tumores inducidos por PVH típicamente muestran esta disfunción). Debido a lo anterior, los VAOs con ciertas mutaciones en E1A no pueden replicarse en un tejido normal.

Por otra parte, las células transformadas por PVH muestran otra característica que favorece la replicación de los vectores adenovirales con mutaciones en E1A. Estructural y funcionalmente, pE7 de PVH es muy similar a E1A de adenovirus, por lo que los vectores adenovirales con mutaciones en E1A pueden replicarse con mayor facilidad en presencia de E7 de PVH, pues esta última complementa positivamente a E1A.^{24,25}

De acuerdo a lo anterior, hay varios mecanismos moleculares que pueden utilizarse para favorecer la replicación de un vector adenoviral en neoplasias asociadas a PVH: 1) existe un promotor altamente activo y selectivo en células con PVH (promotor URR); 2) mutaciones en el gen E1A adenoviral pueden ser complementadas por pE7 de PVH, favoreciendo su replicación en células con PVH. El presente trabajo propone el uso de estos mecanismos para generar nuevos vectores terapéuticos en contra de neoplasias asociadas a PVH mediante el control de la expresión del gen E1A adenoviral con el promotor URR, y mediante la generación de mutaciones en el gen E1A adenoviral.

El objetivo de esta investigación fue generar y probar una serie de vectores adenovirales oncolíticos para neoplasias asociadas a PVH. Los vectores construidos son controlados por la principal región promotora (URR) de la variante asiático-americana del PVH-16, los cuales contienen además diferentes mutaciones en la región E1A adenoviral (dl1015 y/o D24).

Métodos

Plásmidos y vectores

Un fragmento de DNA de 618pb de la región URR del genoma de PVH-16 se amplificó a partir de muestras clínicas de CaCU, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los iniciadores p97-1 (3'-TTT GCT ACG TCG ACTTTT TGT TTT AT-5') y p97-2 (3'-TCTTTT GGT GAT CAA AAT GTC TGC-5'). El produc-

to amplificado se clonó en el plásmido pBlueScript SK + (pBS) y generó un nuevo plásmido (pBS-URR), el cual fue posteriormente secuenciado. Se identificó y reportó la región URR de ocho PVH-16 variedad europea (E) y una variedad asiático-americana (AA) (números de acceso a GenBank AY552070 a AY552078). Se seleccionó a un promotor de la variedad E y otro AA para probar su expresión *in vitro* empleando el gen reportero EGFP del plásmido pGREEN lantern-1 (Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA). El promotor AA fue seleccionado para las futuras construcciones, ya que mostró la más fuerte actividad promotora de las regiones URR probadas (dato no mostrado). En ensayos preliminares de expresión realizados en la línea celular SiHa (portadora de PVH-16), este promotor fue apenas 40% menos potente que el promotor corto constitutivo de CMV, el cual es uno de los promotores virales más fuertes empleados en ensayos de expresión. Las regiones nativa de E1A y mutada de CR2 (E1A Δ 24) fueron aisladas de los plásmidos pXC.1 (Microbix, Toronto, Ontario, Canadá) y pSp-E1A Δ 24, respectivamente.²⁶ La mutación CR1 (CR1-, previamente reportada como dl1015)²⁴ se generó mediante la amplificación de la región E1A en dos fragmentos, que excluían la región CR1, con los iniciadores: E1A5 (5'-CGA CAC CGT GAT CAA AAA TGA GAC ATA TT-3') y E1A2 (5'-ATC AGC TGC TCG AGA AGA CTG G-3') para el primer segmento; y E1A3 (5'-GCA GAT TTT TCT CGA GTC TGT AAT GTT GG-3') y E1A4 (5'-GTA TCT CAG GAG GTG TGT TAG AAG G-3') para la segunda porción. La posterior ligación de los dos productos, con adaptador *Xho*I, generó al gen E1A CR1-. La combinación de las mutaciones CR1/CR2 (CR1- Δ 24) se generó mediante la ligación de un producto amplificado del plásmido pXC.1 con los iniciadores E1A5/2 con un segundo fragmento amplificado de pSp-E1A Δ 24 con los iniciadores E1A3/4. El segmento E1A Δ 24 se obtuvo amplificando la región E1A con los iniciadores E1A5/4 a partir del plásmido pSp-E1A Δ 24. Los genes E1A

mutados (E1Am) y silvestre se ligaron al segmento URR en el plásmido pBS-URR. La secuencia URR-E1A se aisló del plasmado pBS con los sitios de restricción *Sall* (sitio artificial en el extremo 5' del iniciador p97-1) y *Xba*I (sitio nativo en el extremo final de E1A) para luego ser ligados a la señal de poliadenilación (polyA) del gen timidina quinasa de herpes simplex virus (HSV-TK) previamente digerida con las enzimas *Not*I y *Sall*. El segmento polyA-URR-E1A se introdujo en el

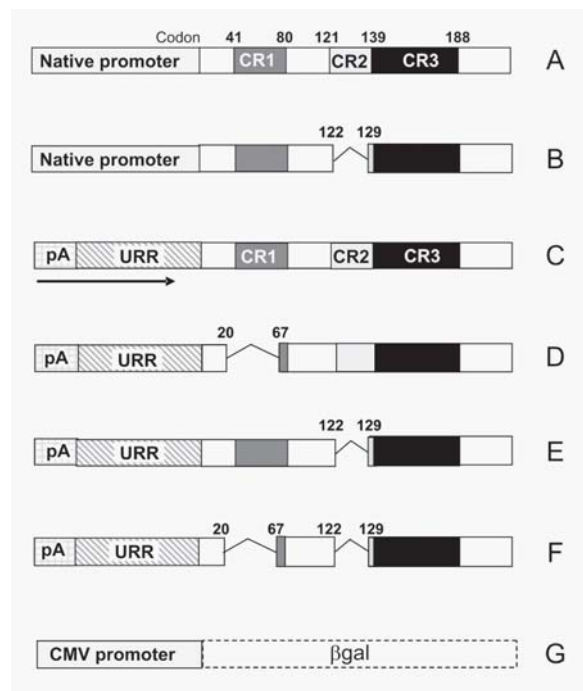


Fig. 2. Modificaciones genéticas en los vectores adenovirales oncolíticos. (A) Ad-wt, el adenovirus tipo silvestre (Ad5). (B) El vector Ad-E1A Δ 24, que contiene el promotor nativo de adenovirus controlando al gen E1A que ha sido deletado de la región ubicada entre los codones 122 y 129 de la región CR2 (mutación Δ 24). (C) El vector Ad-URR/E1A, el cual contiene al promotor de la variante asiático-americano de PVH-16, dirigiendo al gen E1A no modificado. (D) El vector Ad-URR/E1ACR1 contiene la delección de E1A entre los codones 20 y 67 de la región CR1 (mutación dl1015). (E) El vector Ad-URR/E1A Δ 24. (F) El vector Ad-URR/E1ACR1- Δ 24 contiene una combinación de las mutaciones dl1015 y Δ 24. (G) Ad-CMV/ β gal, un vector no competente en replicación que codifica para la proteína β gal de *E. coli*. Las regiones promotoras también se muestran. pA: señal de poliadenilación (usada como un elemento "aislador" para bloquear la interferencia del promotor adenoviral nativo sobre E1A).

plásmido pSp-E1AΔ24 usando los sitios *NotI* y *XbaI* para generar los vectores acarreadores (figura 2). Los plásmidos resultantes fueron cotransformados con el plásmido pAd5 (portador del genoma adenoviral) en células competentes *E. coli* BJ5183 para generar los genomas de los adenovirus recombinantes (figura 2). El adenovirus humano tipo 5 silvestre (Ad-wt) y el adenovirus no competente en replicación Ad-CMV/ β gal²⁷ se usaron como controles experimentales. Los vectores virales se generaron y produjeron en células HEK 293, siguiendo los protocolos de Quantum Biotechnologies (Carlsbad, CA, USA). La purificación de los vectores adenovirales se realizó en un doble gradiente de CsCl con protocolos previamente estandarizados.²⁸

Cultivo celular

Las células humanas PVH+ usadas en los ensayos fueron: SiHa (cervix, PVH-16), Ca SKi (cervix, PVH-16), and HeLa (cervix, PVH-18). Las células PVH- empleadas fueron: HEK-293 (riñón, línea celular de control), Du 145 (próstata), AGS (estómago), Huh7 (hígado), HepG2 (hígado), HuTu 80 (duodeno), JAR (placenta), SW-13 (glándula adrenal), U-87 MG (cerebro), and SK-N-SH (cerebro). AGS fue mantenida en medio RPMI 1640 (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA). SiHa, Ca SKi, HeLa, HEK-293, DU 145, HepG2, HuTu 80, JAR, SW-13, U-87 MG, y SK-N-SH se mantuvieron en medio DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA). Todas las líneas se suplementaron con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA) a 37 °C, 5% CO₂ y 97% de humedad relativa.

Ensayo de producción de partículas virales

La producción de virus es uno de los ensayos más relevantes para la evaluación de los VARS.²⁹ Para determinar la producción de vector, 10⁵ células/pozo fueron sembradas en platos de 24 pozos e infectadas 12 h después con 10⁸ partículas virales

(pv)/mL durante una hora. Las células se lavaron dos veces con medio DMEM y, posteriormente, se incubaron con medio a 2% de SBF. Dos días después de la infección, las células fueron desprendidas, sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación, y los títulos virales fueron determinados por un ensayo estándar en placas con células HEK 293. Para su interpretación se utilizó la dosis inhibitoria 50 por mililitro del cultivo celular (TCID₅₀/mL). Los resultados de la TCID₅₀/mL de cada vector fueron normalizados con los respectivos valores en la línea control HEK-293.

Ensayo de citotoxicidad

Diez mil células por pozo se sembraron en platos con un formato de 96. Después de 6 h, las células fueron infectadas con concentraciones crecientes de vector (0 y dosis logarítmicas de 10² a 10¹⁰ pv/mL) por una hora. Seis días después, la viabilidad se determinó con el ensayo de Azul Alamar (Alamar Biosciences, Sacramento, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo fue leído colorimétricamente y la viabilidad existente en cada pozo se determinó al comparar sus valores con los de pozos no infectados (100% de viabilidad). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Las curvas de viabilidad celular se analizaron mediante la prueba de ANOVA en el programa SPSS versión 12.

Determinación de las copias de genoma viral y de la expresión de E1A por PCR en tiempo real

Frascos de cultivo T-25 con 6 × 10⁵ células fueron infectados con el vector Ad-wt o Ad-URR/E1AΔ24 a 10⁸ pv/mL por una hora. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con medio e incubadas por dos días. Las células fueron desprendidas, lavadas dos veces y empastilladas por centrifugación. El DNA y RNA celular se aislaron para la cuantificación de copias de genoma adenoviral y de la expresión del gen E1A, respecti-

vamente. El DNA se aisló mediante una extracción fenol/cloroformo y el RNA se obtuvo con el kit RNeasy mini (Qiagen Inc., Valencia CA, USA), fue tratado con RNAsa (Invitrogen) y retrotranscrito a DNA complementario (cDNA) con el estuche Super Script II transcriptasa reversa (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Una muestra de RNA de cada ensayo se procesó sin utilizar transcriptasa reversa (reemplazada con agua) para obtener un control del DNA de fondo (CDF). La PCR en tiempo real se realizó con el sistema de detección ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con iniciadores y sonda diseñados para la región terminal de E1A (amablemente diseñados por los Drs. Gregory y Nancy Shipley, del Quantitative Genomics Core Laboratory, de la University of Texas Health Science Center, Houston, Texas, USA). Los iniciadores usados fueron: 1466(+) 5'-AGGCTGTGGAATGTATCGA-3'; y 1530(-) 5'-TTTACAGCTCAAGTCCAAAGG-3'; y la sonda empleada fue la 1488(+) FAM 5'-CTTGCTTAACGAGCCTGGGCA-3'. Una curva estándar con 0 a 10^8 copias de DNA viral fue usada para la cuantificación. Las copias de genoma adenoviral o de transcriptos (RNA) de E1A se expresaron por nanogramo de DNA geonómico o cDNA total, respectivamente. En el ensayo para determinar la expresión de E1A, para cada muestra se colocaron tubos con el mismo volumen de CDF o cDNA para eliminar la lectura del DNA de fondo y normalizar el resultado a cero.

Estudios *in vivo*

Se generó un modelo murino xenotransplantado de neoplasias asociadas a PVH mediante la inyección subcutánea de seis millones de células en ambos lados de la región dorsal del ratón. Con éstos se generaron tumores bilaterales. La cepa de ratón utilizada fue Foxn1nu (hembras de 6 a 8 semanas de Harlan México, México DF) y las líneas celulares inyectadas fueron HeLa y SiHa. La eficacia antitumoral se evaluó mediante el creci-

miento tumoral y curvas de supervivencia. Para ello, los ratones se dividieron en tres grupos una vez que los tumores alcanzaron 4 mm de diámetro, y se inyectaron únicamente los tumores del lado derecho con solución salina o vectores experimentales. El tumor del lado izquierdo permaneció intacto para evaluar el efecto sistémico del tratamiento antitumoral. Se aplicaron siete inyecciones intratumorales de cada vector a dosis de 10^8 partículas virales infecciosas (pfu) en el transcurso de dos semanas.

Los tumores se midieron cada semana con un calibrador tipo Vernier y el volumen tumoral se calculó con la fórmula $LS^2/2$; en donde S es la medida más corta y L representa el diámetro más largo del tumor. Por protocolo, los ratones fueron sacrificados cuando uno de los tumores alcanzaba 20 mm de diámetro. Todos los animales fueron manipulados siguiendo la Norma Oficial Mexicana (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Las comparaciones estadísticas de las curvas de crecimiento tumoral se realizaron con procedimientos no paramétricos, según Koziol *et al.* La supervivencia se analizó con curvas de Kaplan Meier con el programa MedCalc (versión 8.1.0.0 para Windows; Mariakerke, Bélgica). Para analizar la presencia del VAO Ad-URR/E1A Δ 24 en tumores no tratados, se recuperaron biopsias de tumor en algunos ratones sacrificados al día 19 de implantación del tumor (siete días después de la inyección final), y además se procesaron para obtener lisados crudos para la titulación del vector y cuantificación de copias de genoma del VAO.

Para el aislamiento de DNA, 100 mg se incubaron a 55°C por 3 h en 400 μ L de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 5 mM EDTA, 0.5 % SDS, 100 mM NaCl), 10 μ L de SDS 10 % y 45 μ L de proteinasa K 10 mg/ μ L. El DNA se recuperó con extracción fenol: cloroformo y precipitado con etanol. Las copias adenovirales fueron medidas como se describe en la PCR en tiempo real. Adicionalmente, 100 mg de tejido tumoral fue-

Tabla I. Análisis multigrupo para sexo como variable moderadora.

	PVH+			PVH-					
	HeLa	SiHa	Ca Ski	HepG2	Huh7	SK-N	JAR	U87	293
Ad-UCR1⁺	27.3	0.33	0.17	0.39	0.01	0.26	0.25	0.31	1000
Ad-UΔ24	1384	125.9	2511	0.69	0.02	1.23	0.28	1.58	1000
Ad-UCR1⁺/Δ24	0.05	0.04	0.22	0.12	0.01	0.11	0.28	0.14	1000
Ad-CMV/βGal	0.05	0.04	0.22	0.12	0.01	0.11	0.28	0.14	1000
Ad-wt	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

^a Los títulos fueron normalizados a 1000 partículas virales/mililitro producidas en células HEK 293 y a 1000 partículas virales/mililitro producidas por el vector Ad-wt en cada línea celular.

ron resuspendidos y disgregados por tres ciclos de congelación-descongelación en 1 mL de medio DMEM. El título de VAOs se determinó mediante el ensayo en placa con células HEK-293 y se reportó como TCID₅₀ por miligramo de tejido.

Resultados

Replicación selectiva

El resultado más importante fue la enorme capacidad replicativa del vector Ad-URR/E1A Δ 24 en células PVH+. Este vector genera partículas virales al mismo nivel que el Ad-wt en líneas

celulares PVH+, pero su replicación está muy reprimida en todas las células PVH-, demostrando gran selectividad y potencia. Como se muestra en la figura 3 y tabla I, el vector Ad-URR/E1A Δ 24 produce en promedio 1,763 veces más partículas virales en líneas celulares PVH+ que en sus contrapartes PVH-. En contraste, la producción viral de este vector es incluso 2.5 veces mayor que la del Ad-wt en la línea celular Ca SKi, mientras que tiene una replicación 50,000 veces menor en la línea hepática Huh7. La replicación de los vectores Ad-URR/E1ACR1- y Ad-URR/E1ACR1- Δ 24 fue pobre en todas las líneas celulares, sin importar la presencia o ausencia de PVH e incluso en algunas líneas PVH+, su nivel de replicación no fue diferente al del vector no replicante Ad-CMV/ β gal.

Citotoxicidad selectiva

Debido a los resultados en el ensayo de replicación, se seleccionó al vector Ad-URR/E1A Δ 24 y a los vectores controles Ad-wt y Ad-CMV/ β gal para los ensayos de toxicidad (figura 4). El efecto citotóxico de los vectores Ad-URR/E1A Δ 24 y Ad-wt fue muy similar en líneas PVH+ y claramente diferente a la toxicidad del vector no replicante Ad-CMV/ β gal (resultados de ANOVA: $p = 0.013$,

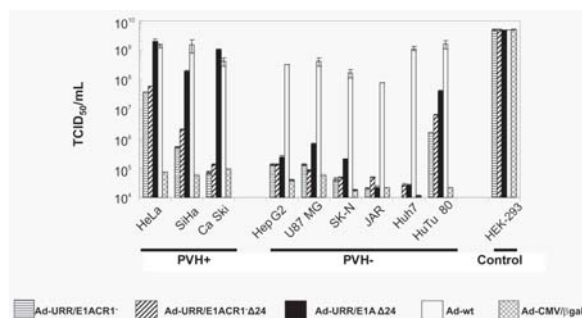


Fig. 3. Ensayo de replicación de los VAOs. Líneas celulares PVH+ y PVH- fueron infectadas con 1×10^8 partículas virales (vp) por mililitro por 1 h. Dos días después de la infección, las células fueron colectadas para titular la producción viral sobre células HEK-293. El adenovirus silvestre (Ad-wt) se usó como referencia de no atenuación replicativa.

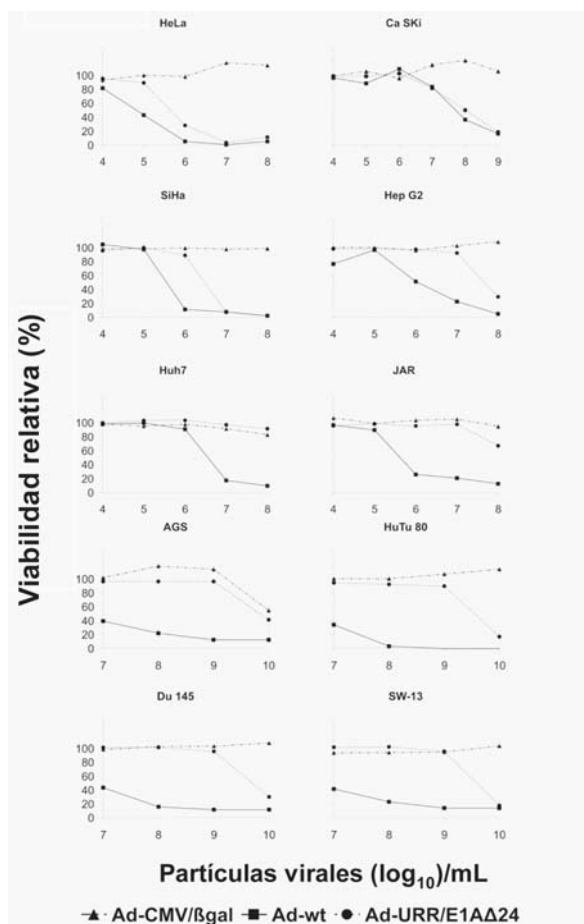


Fig. 4. Efecto citotóxico del vector Ad-URR/E1AΔ24 en células PVH+ y PVH-. Se observa que el Ad-el vector URR/E1AΔ24 reduce la viabilidad de manera similar al vector Ad-wt en células PVH+ (HeLa, SiHa y Ca Ski), en tanto que se comporta de manera similar al vector no replicante Ad-CMV/βgal en células PVH- (Huh7, HepG2, JAR, AGS, HuTu 80, Du 145 y SW-13).

0.007, and >0.001 para SiHa, CasKi, and HeLa; respectivamente).

En contraste, la citotoxicidad del vector Ad-URR/E1AΔ24 fue severamente atenuada en líneas celulares PVH-, similar a la del vector Ad-CMV/βgal, pero significativamente diferente a la toxicidad del vector Ad-wt (resultados de ANOVA: $p = 0.001$, 0.008 , y >0.001 para HepG2, Huh7 y JAR; respectivamente). Este resultado muestra la gran potencia y selectividad del vector Ad-URR/E1AΔ24 hacia las células PVH+ derivadas de las modificaciones genéticas que presenta.

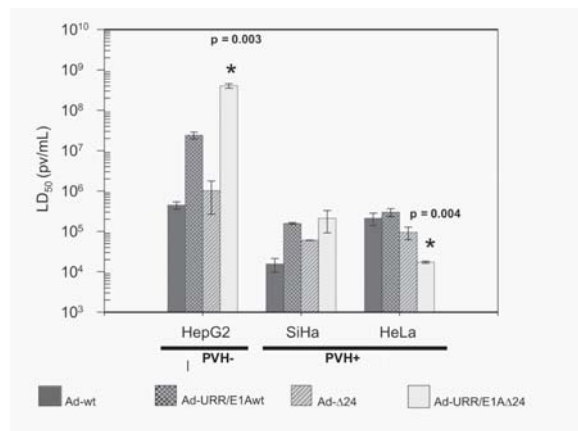


Fig. 5. DL50 alcanzada por cada uno de los vectores en líneas celulares Hep G2, SiHa y HeLa. Las DL50 se determinaron a partir de los datos de citotoxicidad relativa. Se observa que la citotoxicidad del vector Ad-URR/E1AΔ24 es similar a la de los vectores Ad-wt y Ad-Δ24 en la línea SiHa y es más citotóxica que estos en la línea HeLa. Llama la atención la baja citotoxicidad del vector Ad-URR/E1AΔ24 en la línea hepática.

Para dilucidar el papel de las modificaciones genéticas dentro del vector Ad-URR/E1AΔ24 y determinar a cuál de ellas se le puede atribuir la potencia y selectividad del vector, se realizaron ensayos *in vitro* de dosis letal 50 (DL₅₀) con los vectores Ad-URR/E1AΔ24, Ad-Δ24, y Ad-URR/E1Awt en las líneas SiHa, HeLa y Hep G2 (figura 5).

Como se puede observar, en la línea celular SiHa no existe una diferencia significativa ($p = 0.096$) en la letalidad de los VARS Ad-URR/E1AΔ24 y Ad-Δ24, lo que indica que la inclusión de un promotor URR no afecta su potencial citotóxico. En la línea celular HeLa se puede observar un efecto citotóxico superior con el VARS Ad-URR/E1AΔ24 que con el VARS Ad-Δ24 ($p = 0.004$), lo que indica su capacidad citotóxica a pesar de tratarse de una línea celular transformada por PVH-18. En la línea celular HepG2 se observa un claro incremento de la atenuación citotóxica en el VARS Ad-URR/E1AΔ24, con respecto al VARS Ad-Δ24 ($p = 0.003$). Además es de notar que la DL₅₀ para el VARS Ad-URR/E1AΔ24 es 4.04×10^8 pv/mL, mientras que los valores de DL₅₀ para los VARS Ad-URR/E1Awt y Ad-Δ24 son

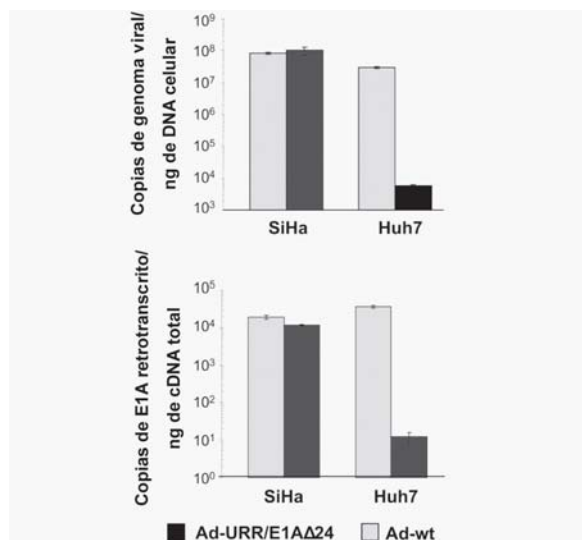


Fig. 6. PCR cuantitativa para determinar el número de copias de vector (arriba) y la expresión de E1A (abajo) en células PVH+ y PVH- infectadas con Ad-URR/E1AΔ24 y Ad-wt. Los ensayos se realizaron después de la infección de las líneas celulares SiHa (cáncer cervico-uterino) y Huh7 (hepatocarcinoma) con 167 partículas virales/célula. En el ensayo de número de copias se observa que ambos vectores se replican con la misma eficiencia en células PVH+, en tanto que la replicación de Ad-URR/E1AΔ24 está grandemente atenuada en la línea PVH-. Un resultado concordante se encontró en el ensayo de expresión génica de E1A.

de 2.41×10^7 y 1.02×10^6 pv/mL, respectivamente, lo que indica que la DL_{50} del VARS Ad-URR/E1AΔ24 es superior a la suma de la DL_{50} de los VARS Ad-URR/E1Awt y Ad-Δ24, sugiriendo un efecto sinérgico de ambas modificaciones que protege a la línea celular hepática.

Análisis cuantitativos por PCR de la producción de genomas virales y expresión del gen E1A

Sólo los vectores Ad-URR/E1AΔ24 y Ad-wt fueron probados con esta metodología. Células SiHa (PVH+) y Huh7 (PVH-) fueron infectadas con los vectores Ad-URR/E1AΔ24 y Ad-wt. La producción de genomas en células SiHa fue similar con ambos vectores, pero ésta fue 5,363 veces menor para el vector Ad-URR/E1AΔ24, en comparación con el vector Ad-wt, en células Huh7 (PVH-) (figura 6). La expresión génica de E1A a partir del vector

Ad-URR/E1AΔ24 fue muy reprimida en células Huh7 (3,004 veces menor comparada con la del vector Ad-wt), en tanto que ésta fue similar con ambos vectores en células SiHa.

Estudios *in vivo*

Estos ensayos estuvieron enfocados a demostrar la eficacia de la inyección intratumoral del vector Ad-URR/E1AΔ24, así como el efecto a distancia del vector sobre un tumor ubicado de manera contralateral (figura 7). Tumores xenotransplantados subcutáneamente fueron generados con células HeLa (PVH-18) y SiHa (PVH-16). En ambos casos, el vector terapéutico fue capaz de restringir el crecimiento de los tumores inyectados ($p > 0.0001$, para los tumores de HeLa y SiHa) y en los no inyectados ($p > 0.0001$, para los tumores de HeLa y SiHa) en comparación con tumores de ratones tratados con solución salina o vector no replicante. Sin embargo, el efecto antitumoral fue más evidente en los tumores de SiHa. Estos resultados concuerdan con la supervivencia de los ratones (figura 9), los cuales tuvieron un 80 y 83% de sobrevida al día 90 postratamiento, en claro contraste con la sobrevida de los ratones tratados con Ad-CMV/βgal o solución salina ($p=0.0057$ y 0.0089 en los modelos de HeLa y SiHa, respectivamente).

Además, se determinó la presencia y actividad del VAO en tumores contralaterales no inyectados. Para estos estudios se analizaron los tumores contralaterales no inyectados, obtenidos al día siete después de la última dosis del VAO Ad-URR/E1AΔ24. No se observó diferencia significativa entre los tumores inyectados y no inyectados en el número de copias de genomas de Ad-URR/E1AΔ24 ($p = 0.265$) ni para la $TCID_{50}$ ($p = 0.149$), aunque los títulos del vector en tumores no inyectados fueron 46 veces más bajos (figura 9). Estos resultados confirman la actividad anti-neoplásica del Ad-URR/E1AΔ24.

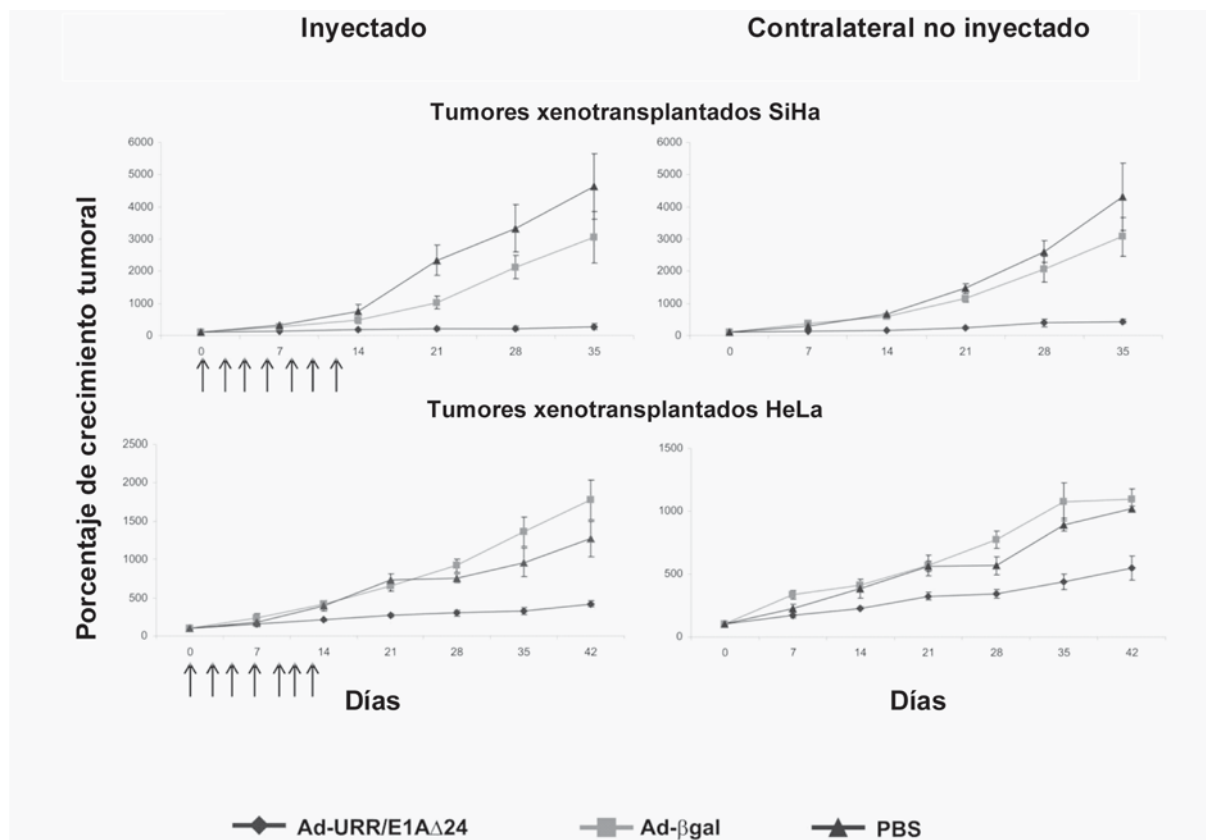


Fig. 7. Crecimiento tumoral del modelo murino con células SiHa (PVH-16) y HeLa (PVH-18). Se observa claramente que los tumores del grupo de ratones tratados con Ad-URR/E1AΔ24 crecen a un ritmo significativamente menor que los tumores del resto de los grupos, tanto en los tumores inyectados, como en los contralaterales no inyectados. PBS=Solución salina. Se grafican promedios con su error estándar. Las flechas indican la administración intratumoral de los vectores o PBS. n= 6 para Ad-URR/E1AΔ24, 5 para Ad-wt y 5 para Ad-CMV/βgal.

Discusión

En el presente trabajo se reporta la citotoxicidad de vectores adenovirales oncolíticos en los cuales el gen E1A, principal regulador de la replicación adenoviral, es controlado por el promotor URR de PVH-16 variante asiático-americana (AA). Los vectores de los genomas se crearon en combinación con mutaciones en el gen E1A: mutación dl1015 (CR1-), Δ24 (CR2-) y ambas mutaciones juntas (CR1-/CR2-). El promotor URR es altamente expresado en células neoplásicas cervicales y en otras neoplasias asociadas a PVH.²⁰⁻²² La región reguladora URR empleada en los vectores generados deriva del PVH-16, el tipo más común

PVH aislado de tumores y de la variante AA, la cual es la variante que posee el promotor más potente. El promotor URR de PVH-16 (variante europea, según se deduce por la secuencia reportada) se ha usado previamente para controlar la expresión del gen timidina quinasa del *herpes simplex* en un vector plasmídico.³⁰ Este plásmido se probó para terapia génica suicida *in vitro* en células de carcinomas orales, mostrando la utilidad del promotor en el tratamiento de neoplasias asociadas a PVHs. Sin embargo, este promotor nunca se ha usado para controlar de replicación de un vector viral.

En el presente trabajo, el vector Ad-URR/E1AΔ24 fue el más potente en función de su

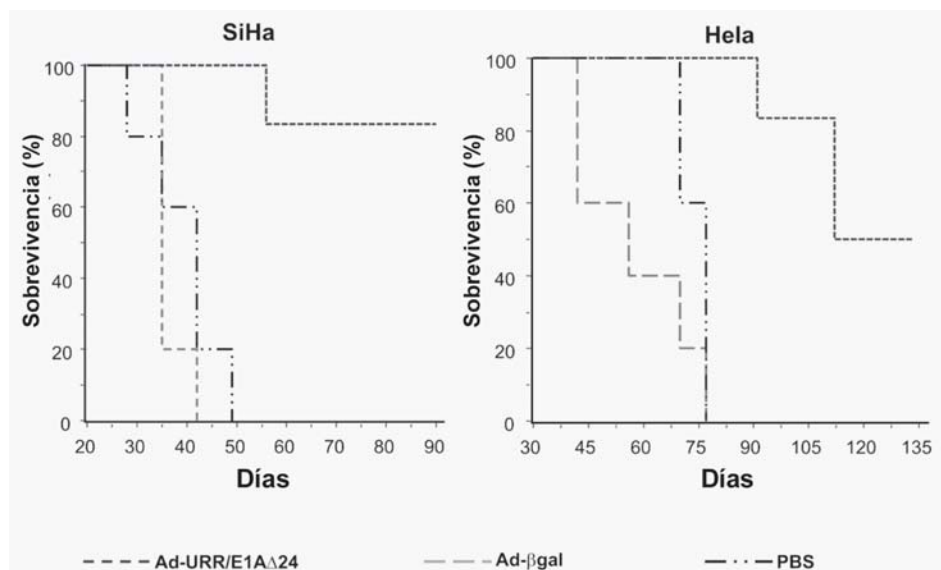


Fig. 8. Supervivencia de ratones en los modelo murinos con células SiHa y HeLa. Se observa que los ratones de los grupos tratados con Ad-URR/E1A Δ 24 sobreviven significativamente más tiempo que los ratones del resto de los grupos, y se mantienen vivos en su mayoría hasta el término del experimento. $n=6$ para los grupos tratados con Ad-URR/E1A Δ 24, 5 para Ad-wt y 5 para Ad-CMV/ β gal.

replicación, citotoxicidad y selectividad hacia células PVH+. La potencia oncolítica y replicativa de este vector fue muy similar a la de un vector silvestre (referencia de máxima potencia adenoviral) en células PVH+, en tanto que fue grandemente atenuado en células PVH-. Los otros vectores, generados y probados en el estudio, Ad-URR/E1ACR1- y Ad-URR/E1ACR1- Δ 24 mostraron un pobre nivel replicativo y citotóxico, aunque un poco de selectividad se observó en algunas líneas celulares. Este último hallazgo sustenta los reportes que previamente han mostrado que grandes deleciones en CR1 confieren selectividad hacia células PVH+ por una posible complementación por parte de pE7 de PVH.^{26,31} Sin embargo, aquí se demuestra que grandes deleciones en CR1 afectan grandemente la potencia de los vectores y limitan su potencial uso terapéutico.

La alta selectividad del vector Ad-URR/E1A Δ 24 se debe a una combinación del promotor URR, y controla la expresión de un gen E1A con la deleción Δ 24 en CR2. Esto se observó después de ensayos con vectores que contenían de manera

aislada al promotor URR, la deleción en CR2 o la combinación de ambas modificaciones genéticas. Por otra parte, los ensayos de PCR cuantitativa de replicación y expresión de E1A en células PVH+ and PVH- corroboran la selectividad del vector Ad-URR/E1A Δ 24 hacia líneas celulares PVH+. Es importante notar que el vector Ad-URR/E1A Δ 24 tiene un muy pobre efecto replicativo y citotóxico (sólo a dosis altas) en células derivadas de hígado, lo cual es un buen indicador de seguridad, considerando que es bien sabido que los efectos adversos de los vectores adenovirales en ensayos clínicos se producen principalmente por daño hepático.

Las mutaciones en las regiones CR1 y CR2 del gen E1A han sido ampliamente estudiadas y se ha demostrado que estas mutaciones en E1A impiden la interacción de esta proteína con miembros de la familia pRb-p300, involucradas en la regulación del ciclo celular.^{24,25} Diversos autores han reportado la potencia de vectores oncolíticos con mutaciones en CR2 y algunos han encontrado que estas modificaciones ocasionan una replicación viral aun mejor que la de un adenovirus

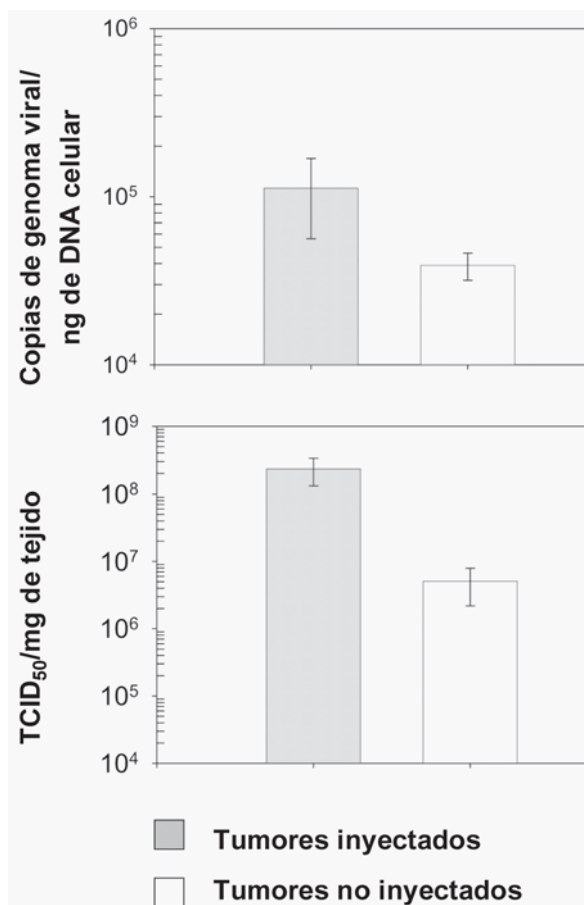


Fig. 9. Análisis de la actividad viral y cuantificación de genomas en tumores contralaterales no inyectados. Cortes tumorales (100 mg) de tumores inyectados y no inyectados fueron procesados al día 19 (siete días después de la inyección final) para determinar el número de copias de genoma adenoviral (mediante PCR en tiempo real) y replicación (por ensayo de titulación en células HEK-293) del Ad-URR/E1A Δ 24. No hubo diferencia significativa en el número de copias de DNA del vector y la replicación entre ambos grupos de tumores ($p = 0.265$ y 0.149 , respectivamente).

silvestre.^{32,33} La mutación Δ 24 en particular afecta la unión de E1A con pRb. Balagué *et al.* mostraron que un vector con la delección Δ 24 ocasiona un gran efecto citopático en células normales y en células que expresan de E6/7 de PVH (similar al producido por el Ad-wt), indicando que esta mutación es incapaz de otorgar selectividad tumoral.²⁶ Este dato implica que la selectividad fina conferida por el promotor URR comandando la replicación viral es crucial en el vector Ad-URR/

E1A Δ 24. Un vector Δ 24 con modificaciones en la proteína de la fibra (Ad5- Δ 24RGD) se reportó recientemente. Este vector muestra un efecto oncolítico similar al Ad-wt en células de cáncer cervical;³⁴ sin embargo, es posible que este vector ocasione un efecto citolítico considerable en células normales en división.

Otra característica importante del vector Ad-URR/E1A Δ 24 es su capacidad replicativa y citolítica en células PVH-16 (SiHa y CaSki) y en PVH-18 (HeLa), indicando que su efecto es independiente al tipo de PVH que infecte a las células, al menos para los dos tipos de PVH más frecuentes.

Los modelos *in vivo* (generados con dos tipos diferentes de células PVH+) demostraron que el vector Ad-URR/E1A Δ 24 fue muy eficiente en el control del crecimiento tumoral, tanto *in situ* como en tumores distantes no inyectados derivados de dos diferentes líneas PVH+; como se demuestra en las gráficas de crecimiento tumoral, supervivencia y análisis molecular y de replicación. La eficacia antitumoral del VAO para controlar el crecimiento de tumores contralaterales sugiere que este vector puede ser capaz de controlar metástasis. Este efecto a distancia se debe a difusión extratumoral del VAO que se inyecta en el tumor y logra su replicación aun en tumores distantes, esta actividad no es influida por el sistema inmune, pues el modelo murino utilizado es inmunodeficiente. Como es de esperarse, los ratones tratados con el vector terapéutico incrementaron su supervivencia por al menos 90 días postratamiento, independientemente del tipo de PVH que posee la línea celular que originó el tumor.

Conclusiones

En conclusión, se demostró la potencia oncolítica del vector Ad-URR/E1A Δ 24 para tumores asociados a PVH, siendo altamente selectivo en ensayos preclínicos *in vitro* e *in vivo*. Se evidenció que la eficacia de este vector se debe a la inclusión del

promotor URR de PVH y de la mutación D24 en el gen E1A, además de que el promotor URR atenua la eficacia oncolítica del VAO en líneas celulares de origen hepático. Este vector es antineoplásico para células PVH+, independientemente del tipo de PVH que presenten las células transformadas, y su efecto probablemente no dependa del origen primario de las células. Debido al gran impacto sobre la salud pública mundial de las neoplasias asociadas a PVH, es posible que este vector sea de gran utilidad para el tratamiento de una variedad de neoplasias premalignas y cancerosas asociadas a PVH.

Resumen

Diversas neoplasias epiteliales están asociadas a papilomavirus humanos (PVH) de alto riesgo, como los cánceres de cérvix, ano-rectal, cabeza y cuello, etc. Los vectores adenovirales oncolíticos (VAOs) han surgido como herramientas antineoplásicas prometedoras con efectos confinados a las células tumorales. Se construyeron una serie de VAOs controlados por la principal región promotora (URR) de la variante asiático-americana del PVH-16, los cuales contienen mutaciones en la región adenoviral E1A (mutaciones dl1015 y/o D24). Los vectores se probaron *in vitro* e *in vivo* para evaluar su replicación, citotoxicidad y potencia oncolítica. El VAO Ad-URR/E1AD24 mostró replicación y potente efecto citopático selectivo para líneas celulares PVH+ similares a las de los vectores más potentes, como el Ad-wt y el Ad-D24; en cuanto a selectividad, este vector es significativamente menos citotóxico para células PVH-. Se comprobó que la selectividad del vector se debe a un efecto sinérgico entre el promotor del PVH (URR) y la mutación en E1A. Finalmente, se confirmó su eficacia antitumoral en un modelo murino y se observó que este tratamiento puede tener un efecto sistémico en tumores distantes no inyectados.

Palabras clave: Papilomavirus, Neoplasmas, Adenovirus, Replicación viral, Citotoxicidad viral.

Abstract

Several human epithelial neoplasms are associated with high risk strains of human papillomavirus (HPV) such as cervical, anorectal, and other carcinomas. For some tumor types the current therapeutic tools are only palliative. Conditionally replicative adenoviruses (CRAds) are promising anti-neoplastic agents, which can also trigger confined antitumor effects. We constructed a series of CRAds driven by the upstream regulatory promoter region (URR) of an Asian-American variant of HPV-16, which contained different mutations at the E1A region (dl1015 and/or D24) and wild-type. All vectors were tested *in vitro* for viral replication and cytotoxicity. Viral DNA replication and E1A expression were also assessed by quantitative PCR. Finally, we confirmed the antitumoral efficacy of this vector in injected and non-injected xenotransplanted cervical tumors in a murine model for tumor regression and survival studies. A vector denominated Ad-URR/E1AD24 displayed a potent cytopathic effect associated with high selectivity for HPV+ cell lines. We found that the oncolytic effect of this CRAd was comparable to Ad-wt or Ad-D24, but this efficacy was significantly attenuated in HPV- cell lines, an effect that was contributed by the URR promoter. Ad-URR/E1A-D24 was very effective to control tumor growth in both injected and non-injected tumors generated with two different HPV+ cell lines. CRAd Ad-URR/E1A-D24 is a highly selective vector for HPV+ cell lines and tumors that preserves the oncolytic efficacy of Ad-wt and Ad-D24. Our preclinical data suggest that this vector may be useful and safe for the treatment of tumors induced by HPV like cervical cancers.

Keywords: Papillomaviruses, Neoplasms, Adenovirus, Cancer therapy, Viral replication, Viral cytotoxicity.

Agradecimientos

Este trabajo fue auspiciado totalmente por el Conacyt-SEP 40330/2002 y por el Paicyt-UANL SA684-02.

Referencias

1. Eckhart W. Viruses and human cancer. 12: Sci Prog 1998;81:315-328.
2. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. Science 1991; 254:1167-1173.
3. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995. 87:796-802.
4. Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology 1991; 184:9-13.
5. Sudbo J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 2001; 345:376-377.
6. World Health Organization. Annex Table 3 Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions. Estimates for 1999. En: World Health Report 2000. <http://www.who.int/whr/2000/en/report.htm>
7. Registro histopatológico de neoplasias malignas. Compendio mortalidad y morbilidad 1998. Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud de México. 2000.
8. Howley P.M., Lowy D.R. Papillomaviruses and their replication (chapter 65) y Lowy D.R., Howley P.M. Papillomaviruses (chapter 66). En: Fields Virology, 4th edition. Fields B.N., Howley P.M., Griffin D.E. (editors). Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Philadelphia, EE.UU. 2001. pp. 2197-2264.
9. Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2002; 52:23-47.
10. Daling J.R., Madeleine M.M., Schwartz S.M. et al. A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. Gynecol Oncol. 2002; 84:263-270.
11. Humbey O., Cairey-Remonnay S., Guerrini J.S. et al. Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas. Eur J Cancer. 2003;39:684-690.
12. Rubin M.A., Kleter B., Zhou M. et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. Am J Pathol. 2001;159:1211-1218.
13. Shroyer K.R., Brookes C.G., Markham N.E., Shroyer A.L. Detection of human papillomavirus in anorectal squamous cell carcinoma. Correlation with basaloid pattern of differentiation. Am J Clin Pathol. 1995; 104:299-305.
14. Uobe K., Masuno K., Fang Y.R. et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. Oral Oncol. 2001; 37:146-152.
15. Miller B.A., Davidson M., Myerson D. et al. Human papillomavirus type 16 DNA in esophageal carcinomas from Alaska Natives. Int J Cancer. 1997;71:218-222.
16. Hirayasu T., Iwamasa T., Kamada Y. et al. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. J Clin Pathol. 1996;49:810-817.
17. Waggoner S.E. Cervical cancer. Lancet 2003. 361:2217-25.
18. Burd E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003. 16(1):1-17.
19. Crum C.P., Muovo G.J., Lee K.R. En: The cervix (chapter 52). Diagnostic Surgical Pathology. 3rd edition. Sternberg S.S.,

- Antonioli D.A. (editors). Lippincott Williams & Wilkins publishers. Baltimore, EE.UU. 1999. pp. 2155-2202.
20. Morris P.J., Dent C.L., Ring C.J., Latchman D.S. The octamer binding site in the PVH16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:1019-1023.
 21. Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 690-698.
 22. Pillai M.R. et al. High-risk human papillomavirus infection and E6 protein expression in lesions of the uterine cervix. *Pathobiology* 1998;66:240-246.
 23. Saukkonen K., Hemminki A. Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4:683-696.
 24. Wong H.K., Ziff E.B. Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate adenovirus serotype 5 early promoters. *J. Virol* 1994;68:4910-4920.
 25. Steinwaerder D.S., Carlson C.A., Lieber A. Human papilloma virus E6 and E7 proteins support DNA replication of adenoviruses deleted for the E1A and E1B genes. *Mol Ther* 2001;4:211-216
 26. Balague C. et al. Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Virol* 2001; 75:7602-611.
 27. Chen S.H. et al. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 3054-3057.
 28. Quantum Biotechnologies. AdEasy Vector System. Application Manual, Version 1.2. Montreal, Canada. Pp. 1-53.
 29. Alemany R., Balague C., Curiel D.T. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2000;18: 723-727.
 30. Sethi N., Palefsky J. Treatment of human papillomavirus (HPV) type 16-infected cells using herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-mediated gene therapy
 31. Steinwaerder D.S., Carlson C.A., Lieber A. Human papilloma virus E6 and E7 proteins support DNA replication of adenoviruses deleted for the E1A and E1B genes. *Mol Ther* 2001;4:211-216.
 32. Fueyo J. et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 1999; 19:1-11.
 33. Heise C. et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 2000; 6:1134-1139.
 34. Bauerschmitz G.J. et al. Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer. *Int J Cancer* 2004; 111:303-309.

Recibido: 1 de septiembre de 2008

Aceptado: 12 de septiembre de 2008